

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA  
*Leptospira interrogans* EN CERDAS DE CINCO GRANJAS  
TECNIFICADAS DE GUATEMALA, UTILIZANDO LA PRUEBA DE  
MICROAGLUTINACIÓN (MAT)

ANA ELYSA MARÍA MEDINA DUQUE

GUATEMALA, FEBRERO DE 2008

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA  
*Leptospira interrogans* EN CERDAS DE CINCO GRANJAS  
TECNIFICADAS DE GUATEMALA, UTILIZANDO LA PRUEBA DE  
MICROAGLUTINACIÓN (MAT)

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA  
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

ANA ELYSA MARÍA MEDINA DUQUE

AL CONFERÍRSELE EL GRADO ACADÉMICO DE

MÉDICA VETERINARIA

GUATEMALA, FEBRERO DE 2008

**JUNTA DIRECTIVA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**DECANO:** Lic. Zoot. Marco Vinicio De La Rosa Montepeque  
**SECRETARIO:** Med. Vet. Marco Vinicio García Urbina  
**VOCAL I:** Med. Vet. Yeri Edgardo Véliz Porrás  
**VOCAL II:** Mag. Sc. M.V. Fredy Rolando González Guerrero  
**VOCAL III:** Med. Vet. Edgar Bailey Vargas  
**VOCAL IV:** Br. José Abraham Ramírez Chang  
**VOCAL V:** Br. José Antonio Motta Fuentes

**ASESORES:**

Med. Vet. Yeri Edgardo Véliz Porrás  
Med. Vet. Blanca Josefina Zelaya de Romillo  
Lic. Zoot. Carlos Enrique Corzantes Cruz

## HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En cumplimiento con lo establecido por los estatutos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a consideración de ustedes el trabajo de tesis titulado:

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA *Leptospira interrogans* EN CERDAS DE CINCO GRANJAS TECNIFICADAS DE GUATEMALA, UTILIZANDO LA PRUEBA DE MICROAGLUTINACIÓN (MAT)**

Que fuera aprobado por la Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo a optar el título profesional de

**Médica Veterinaria**

## TESIS QUE DEDICO

A DIOS

A MIS PADRES

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

A MIS ASESORES DE TESIS

A MIS COMPAÑEROS DE PROMOCIÓN

A MIS AMIGOS

AL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

Y A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE COLABORARON EN EL  
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN Y EN MI EJERCICIO PROFESIONAL  
SUPERVISADO.

## **ACTO QUE DEDICO**

<b>A DIOS</b>	Por ser mi guía y mi fortaleza.
<b>A MIS PADRES</b>	Por tener siempre confianza en mí y por su apoyo incondicional.
<b>A MIS HERMANOS</b>	Quique y palo, los quiero mucho.
<b>A MIS SOBRINAS</b>	Ana Paula y Valentina que Dios las bendiga.
<b>A MIS AMIGOS</b>	Santiago Soto, Estuardo Ruano, Neto Mejicanos, Chalito Maldonado. Gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas, por ayudarme y sobre todo por haberme brindado su amistad y cariño, los quiero mucho y siempre podrán contar conmigo.
<b>A MIS CATEDRÁTICOS</b>	Gracias por su sabiduría y apoyo.
<b>A MIS ASESORES</b>	Por alentarme a seguir adelante, por su apoyo y sobre todo por confiar en mí y brindarme su amistad.

Un sincero agradecimiento a todas las granjas y su personal que permitieron realizar mi investigación.

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. HIPÓTESIS .....	2
III. OBJETIVOS.....	3
3.1 General.....	3
3.2 Específicos.....	3
IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
4.1 Definición de la enfermedad.....	4
4.2 Etiología.....	4
4.3 Epidemiología.....	5
4.4 Transmisión y patogenia.....	7
4.5 Sintomatología.....	8
4.6 Lesiones.....	10
4.7 Diagnóstico.....	11
4.7.1 Observación directa de leptospiras.....	11
4.7.2 Aislamiento.....	12
4.7.3 Diagnóstico por biología molecular.....	12
4.7.4 Diagnóstico serológico.....	13
4.8 Consideraciones para la toma de muestras.....	14
4.8.1 Fase leptospirémica.....	15
4.8.2 Fase inmunitaria.....	15
4.8.3 Fase leptospirúrica.....	15
4.9 Tratamiento.....	16
4.10 Control y prevención.....	16
4.11 Estrategias de control.....	17
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
5.1 Materiales.....	19

5.1.1 Recursos humanos.....	19
5.1.2 Recursos biológicos.....	19
5.1.3 Recursos de campo.....	19
5.1.4 Recursos de laboratorio.....	20
5.1.5 Presupuesto .....	21
Financiamiento.....	21
5.2 Metodología.....	22
5.2.1 Recolección de muestras.....	22
5.2.2 Grupo de trabajo.....	22
5.2.3 Muestreo.....	22
5.2.4 Preparación del antígeno.....	23
5.2.4.1 Inoculación en medios de cultivo.....	23
5.2.4.2 Preparación de soluciones.....	24
5.2.5 Descripción de la prueba.....	24
5.3. Análisis estadístico.....	26
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
VII. CONCLUSIONES.....	29
VIII. RECOMENDACIONES.....	31
IX. RESUMEN.....	32
X. BIBLIOGRAFIA.....	33
XI. ANEXOS.....	35



## I. INTRODUCCIÓN

La infección por *Leptospira interrogans* serovariedad *Pomona*, es la más frecuente en todos los cerdos. La orina es la fuente principal de contaminación ya que los animales, especialmente cerdos, incluso después de curados clínicamente, pueden eliminar leptospira en la orina por períodos prolongados, por ejemplo las crías porcinas pueden ser portadores por un año y las cerdas adultas hasta dos meses.

A causa de la gran intensidad y de la larga duración de las infecciones en los cerdos, éstos desempeñan una importante función en la epidemiología de la leptospirosis.

Por generarse problemas en el área reproductiva, como infertilidad, abortos, lechones nacidos muertos y lechones nacidos débiles se considera que es una enfermedad que compromete seriamente la economía de una explotación.

El diagnóstico de la *leptospira interrogans* es complicado, dadas las especiales características de este género y la dificultad que conlleva su cultivo. La serología, en conjunto con los signos clínicos, ayuda a un diagnóstico más preciso; en donde el método de referencia es la microaglutinación (MAT), el cual se emplea para detectar anticuerpos en animales sospechosos o enfermos.

## II. HIPÓTESIS

Un cincuenta por ciento de las cerdas en estudio presentan anticuerpos contra *Leptospira interrogans*.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 GENERAL:

- Contribuir al estudio de enfermedades infecciosas que afectan a cerdas de granjas tecnificadas.

#### 3.2 ESPECÍFICOS:

- Determinar la presencia de anticuerpos circulantes de *Leptospira interrogans*, en las cerdas en estudio.
- Determinar las serovariedades más predominantes de *Leptospira interrogans* que están afectando a las cerdas.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 DEFINICIÓN DE LA ENFERMEDAD:

La leptospirosis es una antropozoonosis de distribución mundial, causada por espiroquetas patógenas del género *Leptospira* y caracterizada por una vasculitis generalizada. Los cerdos se desempeñan como reservorios de infección para otros animales y el hombre, debido a que excretan grandes cantidades de microorganismos en su orina (leptospiuria) hasta por un año (1, 2).

### 4.2 ETIOLOGÍA:

El agente etiológico de la leptospirosis pertenece al orden *Spiriochaetales*, familia *Leptospiraceae* y género *Leptospira*, que comprende 2 especies: *L. interrogans*, patógena para los animales y el hombre y *L. biflexa*, que es de vida libre. *L. interrogans* se divide en más de 210 serovares y 23 serogrupos (2, 3).

Entre las serovariedades más comunes que afectan a los cerdos se encuentran:

- *Icterohaemorrhagiae*
- *Canícola*
- *Pomona*

- *Australis*
- *Gryppothyposa*
- *Bratislava (1, 2)*.

*Leptospira interrogans* es una bacteria muy fina, de 6 a 20  $\mu\text{m}$  de largo y 0.1 a 0.2  $\mu\text{m}$  de ancho, flexible, helicoidal, con los extremos encurvados en forma de gancho, extraordinariamente móvil, aerobia estricta, que se cultiva en medios complejos como el EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) y el Tween 80/40 con lactoalbúmina hidrolizada. Puede sobrevivir largo tiempo en el agua, ambiente húmedo o templado, con pH neutro o ligeramente alcalino (13).

#### **4.3 EPIDEMIOLOGÍA:**

Está ampliamente distribuida en el mundo, siendo mayor su prevalencia en las regiones tropicales. Es más frecuente en la población rural que en la urbana, con un pico de prevalencia en la cuarta década de vida.

Favorecen la transmisión las condiciones ambientales en la mayoría de países tropicales y subtropicales de América como: lluvias abundantes, desborde de aguas residuales durante las inundaciones, suelos no ácidos y altas temperaturas.

Afecta a numerosas especies animales, salvajes y domésticas, que son el reservorio y la fuente de infección para el hombre. Los más afectados son los roedores salvajes, perros, vacas, cerdos, caballos y ovejas. En ellos la infección puede ser desde inaparente a severa y causa pérdidas económicas importantes (3).

Los animales infectados eliminan el germen con la orina, contaminando terrenos y aguas. Las leptospiras pueden permanecer durante largos períodos en sus túbulos renales, ya que prefieren el riñón apareciendo en la orina.

La leptospirosis es una antropozoonosis de distribución mundial, siendo la mayor fuente de infección para el hombre la exposición directa a orina de animales infectados o el contacto con agua y/o suelo contaminados con tales orinas, ya sea a través de actividades ocupacionales o recreativas (1).

La población con riesgo de enfermar comprende la que habita zonas endémicas de los países tropicales subdesarrollados; mientras que en los países desarrollados suele ser una enfermedad profesional de los que trabajan con animales o sus productos, o en medios contaminados especialmente por roedores (veterinarios, ganaderos, tamberos, carniceros, trabajadores de frigoríficos, agricultores, trabajadores de la red de saneamiento, limpiadores de alcantarillas, urgadores) (1, 3). El hombre también pueden infectarse en actividades recreativas al entrar en contacto con agua dulce

estancada contaminada (baño, pesca, deportes acuáticos) y por contacto con su mascota.

Por lo general el hombre es un huésped terminal. La transmisión de persona a persona es sumamente rara.

#### **4.4 TRANSMISIÓN Y PATOGENIA:**

El contacto con la orina infectada es la forma más común de contagio.

La leptospira puede penetrar en el cuerpo a través de mucosas, piel intacta o erosionada, vía oral (alimentos contaminados con orina infectada) por vía transplacentaria y por aerosoles inhalados.

Luego entran a la sangre y se multiplican, entre dos y siete días pueden detectarse en vísceras. Entre cinco y diez días se detectan anticuerpos circulantes. En este estadio el microorganismo está localizado en los túbulos renales y cesa la leptospiremia. Durante la leptospiremia, la leptospira cruza la placenta, infecta al feto y penetra las cavidades serosas y se establece en el líquido cerebroespinal y en los túbulos renales proximales, produciendo abortos, mortinatos o nacimiento de lechones débiles (1).

Diferentes serovares de *Leptospira interrogans* han sido encontrados en las cerdas. La serovariedad *Pomona* es la más comúnmente involucrada en la infertilidad. Las serovariedades *Bratislava y Muenchen* también se han encontrado persistentes en el oviducto y útero de hembras no preñadas y, en el tracto genital superior de los verracos, contribuyendo a la infertilidad. Es posible que esta infección pueda contagiarse durante el apareamiento (4).

#### **4.5 SINTOMATOLOGÍA:**

Los cerdos afectados presentan anorexia, diarrea, ictericia y hemoglobinuria, pudiendo haber alta mortalidad.

En lechones se observa un síndrome febril acompañado de meningoencefalitis. Las meningitis pueden estar complicadas con *Streptococcus suis*.

En las cerdas se puede observar infertilidad y retorno al celo. En cerdas gestantes se puede observar hipertermia, anorexia y abortos al final de la gestación (sin lesiones aparentes en fetos abortados).

En infecciones agudas, a consecuencia de la pirexia hay hemoglobinuria, ictericia, anorexia y uremia terminal.



Cuando la infección no lleva a la muerte, la leptospira se elimina por la orina, variando la duración según cada animal y según cada serovar (4, 9).

En casos de infección por la serovariedad *Pomona* y durante el primer mes, la intensidad de eliminación es de más de un millón de leptospiras por mililitro de orina. En infecciones por la serovariedad *Bratislava*, la intensidad es más baja.

Cuando se localiza en el útero causa invasión fetal y abortos entre diez días y cuatro semanas después de la infección. La expulsión de los fetos ocurre entre los cinco y seis días de la muerte de los mismos. Si la invasión fetal ocurre cuando el feto no ha desarrollado todavía una adecuada respuesta inmunitaria, el resultado es la muerte del feto seguida de reabsorción, aborto o mortinato. En los casos que la infección se establece al inicio de la gestación, el embrión es reabsorbido y se observa un fallo de gestación habiendo un bajo porcentaje de partos.

Cuando la infección se establece al final de la gestación, se ve reducido el tamaño de la camada. Si ocurre cuando el feto puede desarrollar una respuesta inmune el suero de los lechones nacidos muertos, contendrá anticuerpos contra la leptospira. En estos casos puede diagnosticarse la leptospirosis desde los fluidos fetales.

Se han localizado leptospiras como *Bratislava y Muenchen* en los oviductos y úteros de las cerdas, seguido de episodios de abortos con lechones infectados. También se pueden localizar las leptospiras en nódulos linfáticos supramamarios. Esto sugiere una persistencia que puede tener respuesta celular y no humoral o que la respuesta inmune humoral no fue detectada por el test de microaglutinación.

En los machos se han encontrado leptospiras en riñón, uretra, vesícula seminal, glándula bulbouretral, próstata y tejido testicular. La alta prevalencia en el tejido testicular y en las vesículas seminales comparado con la que hay en los riñones (más baja aquí), enfatiza la importancia del tracto genital como lugar de localización y persistencia de leptospiras y soporta la sugerencia que se pueda dar una infección venérea.

Dada la relación entre infertilidad y leptospirosis se ha pensado que la infertilidad sea debida al macho. Esto no se ha demostrado, pero sería interesante analizar los machos a la entrada en las granjas dado que es el único animal a veces que entra. Sería aconsejable realizarle la prueba de microaglutinación antes de la monta (4, 9).

#### **4.6 LESIONES:**

Son raras las muertes en cerdas y las lesiones observadas son debidas a hallazgos de matadero o a las lesiones de los lechones

abortados. En brotes agudos se observa septicemia e ictericia en hígado y riñón.

Los fetos abortados de infecciones por la serovariedad *Pomona* y serovariedad *Icterohaemorrhagiae*, pueden estar momificados o con los órganos blanquecinos con o sin ictericia. Un incremento de líquido rojizo está presente a menudo en cavidades orgánicas (6, 9).

Las lesiones renales son el hallazgo más común. La lesión común es un foco blanco grisáceo de uno a tres milímetros de diámetro en la corteza renal. Pueden estar rodeadas por áreas congestivas y pueden encontrarse petequias. Los túbulos renales presentan degeneración del epitelio y los glomérulos están hinchados y algunos tienen monocitos, neutrófilos y linfocitos (1, 6).

## **4.7 DIAGNÓSTICO:**

### **4.7.1 Observación directa de leptospiras:**

El examen microscópico en campo oscuro de sangre, suero, orina o líquido cefalorraquídeo y biopsias es el primer paso que realiza el microbiólogo para el diagnóstico sugestivo de leptospirosis. Tiene la desventaja de poseer una baja sensibilidad y especificidad (1).

#### **4.7.2. Aislamiento:**

Las leptospiras son bacterias exigentes que requieren para su crecimiento condiciones aerobias de 28°C a 30°C, medios semisólidos ricos en proteína (Fletcher).

Las leptospiras obtienen su energía de la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga y no pueden utilizar aminoácidos o carbohidratos como fuentes energéticas importantes. Las leptospiras pueden sobrevivir semanas en agua, particularmente en pH alcalino. Para el aislamiento de la *Leptospira interrogans* pueden utilizarse muestras de líquido cefalorraquídeo, orina, sangre completa, biopsia de hígado, riñón, pulmón y cerebro (1, 3).

#### **4.7.3 Diagnóstico por biología molecular:**

Este es a través de la prueba PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Se realiza a través de muestras de suero, orina, saliva y heces mediante la amplificación de una secuencia de ADN de la *Leptospira* que es específica para dicho agente. Una de las mayores desventajas es que es una técnica de costo elevado, pero su utilidad para el diagnóstico es crítica ya que permite demostrar al agente en los primeros ocho días de la enfermedad, mientras que los anticuerpos aparecen en forma significativa hasta después de los 15 días y el cultivo puede llegar a tardar hasta dos meses.

La técnica de PCR tiene una gran sensibilidad, puede detectar la presencia de dos o tres copias de la secuencia buscada, así como también especificidad ya que puede reconocer género, especie y variedad de un microorganismo en unas cuantas horas (1, 3).

#### **4.7.4 Diagnóstico serológico:**

Hay numerosas técnicas serológicas que se utilizan en el laboratorio de diagnóstico clínico para diagnóstico de leptospirosis, pero en el laboratorio especializado sigue siendo la microaglutinación (MAT) la técnica de preferencia por su especificidad y sensibilidad.

Es conocida a nivel internacional por sus siglas en inglés MAT que significa Microscopic Agglutination Test. Es el método de referencia para la confirmación serológica de una infección reciente y pasada de leptospirosis, en el cual el suero de la cerda se enfrenta con suspensiones de leptospiras vivas de los distintos serovares para:

- Determinar la presencia o ausencia de anticuerpos anti-leptospira aglutinantes para los serovares de leptospira presentes en el suero.
- Identificar los aislamientos.
- Clasificar cepas.
- Servir de base para evaluar cualquier otro método serológico para el diagnóstico de esta enfermedad.

Se puede definir MAT como la técnica que en diluciones seriadas de suero en contacto con una suspensión de leptospiras vivas (antígeno), incubadas a una determinada temperatura y en un período de tiempo, se lee en el microscopio de campo oscuro, considerando, 50% de aglutinación de las leptospiras vivas como el título de corte para la positividad de la reacción.

Las pruebas ELISA e Inmunofluorescencia Indirecta pueden llevarse a cabo pero siempre tenemos que confirmar con MAT (8).

#### **4.8 CONSIDERACIONES PARA LA TOMA DE MUESTRAS**

La interpretación del diagnóstico de leptospirosis en animales se basa en el conocimiento de la situación poblacional, por tal razón es importante el muestreo representativo en diferentes grupos de animales, de acuerdo con la edad y la etapa productiva, los hallazgos encontrados en los diferentes grupos de animales, son complementados con datos epidemiológicos y clínica de la enfermedad.

Para la obtención de la muestra adecuada es necesario el conocimiento de la dinámica de la enfermedad, considerando que la leptospirosis se desarrolla en tres fases: leptospirémica, inmunitaria y leptospirúrica, aspecto importante en la toma de muestras para diagnóstico serológico o aislamiento de la *Leptospira* (1).

#### **4.8.1 Fase leptospirémica:**

Llamada septicémica, tiene una duración de siete a diez días. Se caracteriza por la presencia de *Leptospira spp.* en sangre, las cuales pueden ser aisladas por cultivo de las muestras o por inoculación directa en animales de laboratorio a partir de sangre, orina, macerados de hígado, riñón, bazo, cerebro y pulmón (3).

#### **4.8.2 Fase inmunitaria:**

Se caracteriza por la presencia de los anticuerpos específicos en sangre los cuales pueden ser detectados mediante pruebas serológicas, a partir de la segunda semana del inicio de la enfermedad (3).

#### **4.8.3 Fase leptospirúrica:**

Se caracteriza por la excreción de leptospiras por la orina, siendo posible su aislamiento en esta muestra, a partir de los 15 días del inicio de los síntomas (3).

#### **4.9 TRATAMIENTO:**

El tratamiento clásico de la leptospirosis son las inyecciones parenterales con estreptomina a dosis de 25 mg/kg. Otros antibióticos ensayados han sido la tiamulina y la tetraciclina. (oxitetraciclina, 750 ppm en el pienso por 15 días o tiamulina (1ml/15kg)).

El tratamiento con estreptomina una semana antes del servicio y dos antes del parto se ha mostrado como efectivo para reducir las pérdidas por fallos reproductivos (2, 6).

#### **4.10 CONTROL Y PREVENCIÓN:**

El conocimiento de la epidemiología de la enfermedad es la base de la prevención y control de la infección en animales y humanos.

Las leptospiras permanecen viables en suelos encharcados por más de cuatro meses, en agua estancada por una semana y la continua adición de agua fresca incrementa su supervivencia, las condiciones ambientales y socioculturales favorecen el mantenimiento de la infección.

La vacunación de cerdas con bacterinas conteniendo los serotipos apropiados antes del servicio puede prevenir el aborto.



También pueden vacunarse los lechones en períodos de riesgo (seis a diez semanas de edad); la vacunación induce inmunidad de poca duración y reduce la prevalencia pero no elimina la infección.

Para controlar la enfermedad se recomienda:

- Las desinfecciones principalmente en la zona de destete, por ser este el lugar de mayor contacto directo entre los animales.
- Implementar programas de control de roedores e higiene ambiental.

En resumen la enfermedad puede controlarse por medidas de higiene, programas de vacunación, tratamiento y sacrificio de los portadores (1, 5).

#### **4.11 ESTRATEGIAS DE CONTROL:**

- Mejoramiento de las condiciones higiénico-sanitarias y de manejo poblacional para minimizar la diseminación de la enfermedad.
- Programa de vacunaciones sobre la base de un diagnóstico de laboratorio eficiente y oportuno.
- Tratamientos estratégicos con antibióticos.

- Vigilancia epidemiológica, monitoreos serológicos periódicos en las explotaciones animales (6).

#### 4.11.1 Medidas higiénico-sanitarias (1)

<b>MEDIDAS DE PROFILAXIS HIGIÉNICO- SANITARIAS</b>	
<b>ACCIÓN</b>	<b>EFECTO</b>
Mantener un buen sistema de desagüe	Control de aguas estancadas posible fuente de <i>leptospira interrogans</i> .
Limpieza e higiene de las instalaciones	Efecto sobre control de hospedadores de mantenimiento
Controlar roedores: desratización general de la explotación.	Control de hospedadores de mantenimiento o portadores asociados a la actividad humana.
Evitar el uso de fuentes de agua comunales	Hospedadores silvestres y domésticos
Controlar la entrada de animales al sistema	Introducción de la enfermedad al sistema a través del control previo
Evitar el uso de reproductores posiblemente infectados sin diagnóstico de laboratorio	Disminución de posible transmisión venérea

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 MATERIALES:

#### 5.1.1 Recursos humanos

- Asesores de tesis
- Estudiante investigador
- Personal técnico de granja
- Personal de laboratorio

#### 5.1.2 Recursos biológicos

- 50 Cerdas de granjas tecnificadas no vacunadas contra *Leptospira*.
- Serovariedades de *Leptospira*: *Ballum*, *Bataviae*, *Australis*, *Pomona*, *Icterohaemorrhagiae*, *Hebdomadis*, *Canicola*, *Panamá*, *Sejroe*, *Autumnalis*, *Bratislava*, *Pyrogenes*.

#### 5.1.3 Recursos de campo

- Tubos de ensayo
- Agujas

- Jeringas
- Hielera
- Refrigerante
- Botas
- Overol
- Vehículo

#### **5.1.4 Recursos de laboratorio:**

- Tubos de ensayo
- Microplaca de fondo en U
- Láminas portaobjetos
- Incubadora
- Campana de flujo laminar
- Microscopio de campo oscuro
- Aceite de inmersión
- Micropipetas Unicanal y Multicanal
- Puntas para micropipetas
- Bandejas con desinfectante para descartar material
- Recipientes para cargar micropipetas
- Medios de cultivo (Fletcher, Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris/EMJH)
- Soluciones amortiguadora (SAF)
- Incubadora a 30°C (para el cultivo de las cepas)
- Incubadora a 37°C (para la realización de la prueba)
- Guantes

- Antígenos (serovariedades)
- Pipetas de 1 y 5 ml.

### 5.1.5 Presupuesto

Insumos	Valor en quetzales
Guantes	Q. 42.00
Jeringas	Q. 400.00
Tubos Vacutainer	Q. 150.00
Combustible	Q. 1,500.00
Pruebas MAT *	Q. 1,750.00
Material de oficina	Q. 1,000.00
Imprevistos	Q. 484.20
Total	Q. 5,326.20

\* Microscopic Agglutination test.

### Financiamiento

El estudiante aportó el 100% del presupuesto antes citado.

## **5.2 METODOLOGÍA:**

### **5.2.1 Recolección de muestras:**

Las muestras de sangre fueron recolectadas en cinco granjas tecnificadas localizadas en diferentes departamentos de Guatemala.

### **5.2.2 Grupo de trabajo:**

En cada granja se muestrearon diez hembras no vacunadas contra Leptospirosis, obteniendo la muestra de la vena yugular (5 ml).

### **5.2.3 Muestreo:**

Se realizó un muestreo por conveniencia, debido a que se pretende demostrar la presencia y no la prevalencia de la enfermedad, además del elevado costo de la prueba de microaglutinación en el laboratorio.

## 5.2.4 Preparación del antígeno:

### 5.2.4.1 Inoculación en medios de cultivo:

Una vez preparado el medio de cultivo (EMJH) se procedió a inocular las distintas serovariedades de *Leptospira*.

Se incubó a 30°C por un período de 10 a 15 días, para que los distintos serovares de leptospiras alcanzaran una concentración adecuada.

Luego se realizó un recuento de las espiroquetas móviles o viables para determinar si se ha llegado a la concentración adecuada de los distintos serovares de *Leptospira*, esto se hizo agregando una gota de cultivo en un portaobjetos y se procedió a observar al microscopio de campo oscuro para determinar si se observan más del 50% de leptospiras vivas en el campo.

Estas leptospiras sirvieron para realizar la reacción antígeno-anticuerpo con los sueros de las cerdas que fueron obtenidos de las cinco granjas muestreadas.

#### **5.2.4.2 Preparación de soluciones:**

##### **Solución salina amortiguadora con fosfatos (SAF):**

La solución SAF se preparó mezclando 40 ml de solución amortiguada de Sorensen con 460 ml de solución salina fisiológica.

Se midió el pH (el pH indicado debe de ser de 7.2). Luego se colocó en el autoclave a 121°C durante 15 minutos.

La solución final preparada se guardó en refrigeración a 8°C hasta su uso.

#### **5.2.5 Descripción de la prueba:**

##### **Prueba de aglutinación microscópica (MAT)**

Para la realización de la prueba de MAT se utilizan cultivos de los serovares de leptospiras con 12 a 15 días de desarrollo en medio EMJH líquido o Fletcher, antes de emplearse hay que comprobar la pureza de cada cepa y su morfología, además de la concentración de los microorganismos que se debe ajustar aproximadamente de 1 a  $2 \times 10^6$  leptospiras/ml.



## Técnica del test de microaglutinación:

### Dilución 1/50

1. Se agregaron 4.9 ml de solución amortiguadora (SAF) en los tubos de ensayo vacíos.
2. Luego se agregó en esos mismos tubos 100 microlitros de los sueros a estudiarse, utilizando micropipetas unicanal con diferente punta para cada suero.

### Dilución 1/100

1. Esta dilución se realizó en la placa, colocando 50 microlitros de solución amortiguadora (SAF) en todos los fosos con las pipetas multicanal.
2. Luego se colocaron 50 microlitros de la dilución 1/50 con las pipetas multicanal en todos los fosos.
3. Luego se colocaron por fila 100 microlitros de antígeno de diferente serovariedad de *Leptospira*.
4. El control negativo se preparó agregando 100 microlitros de SAF + 100 microlitros de antígeno.
5. Luego se incubó a 37° C por 1½ horas.

La lectura de la prueba se realizó colocando 8 microlitros de cada foso de los sueros estudiados, en un portaobjetos, se observó

en el microscopio de campo oscuro con un aumento de 16X (seco débil).

La interpretación de la prueba se da como positiva cuando se observa el 50% de la microaglutinación.

### **5.3 Análisis Estadístico:**

Se usó estadística descriptiva (moda) representando los datos de cada granja a través de gráficas y tablas de frecuencia.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 50 muestras de suero obtenidas de cerdas de cinco granjas tecnificadas en Guatemala, 14 fueron seropositivas a la prueba de microaglutinación (MAT), obteniendo 28% (Anexo tabla No. 1).

Mediante la prueba de microaglutinación (MAT) los serovares encontrados que aglutinaron a anticuerpos presentes en el suero fueron 5 siendo los siguientes: *Leptospira interrogans* serovar *Ballum*, *Leptospira interrogans* serovar *Pomona*, *Leptospira interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae*, *Leptospira interrogans* serovar *Panamá*, *Leptospira interrogans* serovar *Pyrogenes* (Anexo tabla No. 1).

Los resultados indican que la serovariedad que se presenta con más frecuencia en las cerdas es la *Pomona* y la que se presenta con menos frecuencia es la *Ballum* (Gráfica No. 1).

En las cinco granjas muestreadas existieron cerdas que fueron seropositivas a las prueba, siendo consideradas como diseminadoras de la enfermedad en las granjas, aunque se debe de tomar en cuenta que los roedores también juegan un papel importante en la transmisión de la enfermedad.

De las 14 cerdas que resultaron seropositivas a Leptospirosis, a través de la prueba de microaglutinación (MAT), ninguna presentó

sintomatología clínica de la enfermedad; indicando que la enfermedad puede ser subclínica y diseminada sin ser previamente detectada.

## VII. CONCLUSIONES

1. La serovariedad *Pomona* fue la que se presentó con mayor frecuencia en las granjas.
2. La serovariedad *Ballum* fue la que se presentó con menor frecuencia en las granjas.
3. El 28% de las cerdas que fueron muestreadas presentaron seropositividad a *Leptospira interrogans*, lo que representa un porcentaje menor al esperado.
4. Las cinco granjas que fueron muestreadas tienen hembras que no han sido vacunadas y que están infectadas con Leptospirosis, éstas juegan un papel importante en la diseminación de la enfermedad en la granja.
5. Se presentaron 5 diferentes serovares en las granjas: *Leptospira interrogans* serovariedad *Pomona*, *Leptospira interrogans* serovariedad *Ballum*, *Leptospira interrogans* serovariedad *Icterohaemorrhagiae*, *Leptospira interrogans* serovariedad *Pyrogenes* y *Leptospira interrogans* serovariedad *Panamá*.
6. Las serovarietades que no se presentaron en ninguna granja fueron: *Leptospira interrogans* serovariedad *Bataviae*, *Leptospira interrogans* serovariedad *australis*, *Leptospira*

*interrogans* serovariedad *Hebdomadis*, *Leptospira interrogans* serovariedad *Canícola*, *Leptospira interrogans* serovariedad *autumnalis*, *Leptospira interrogans* serovariedad *Sejroe* y *Leptospira interrogans* serovariedad *Bratislava*.

## VIII. RECOMENDACIONES

1. Implementar técnicas de control de roedores dependiendo de las necesidades que existan en las granjas porcinas.
2. Implementación de planes profilácticos contra Leptospirosis en todo el hato reproductor de la granja.
3. Mantener una buena limpieza y desinfección en las instalaciones de la granja.
4. Implementar programas de cuarentena al ingreso de los animales nuevos en la granja.
5. Implementar monitoreos serológicos en las diferentes etapas de producción, no sólo en el hato reproductor.

## IX. RESUMEN

Fueron analizados 50 sueros de cerdas no vacunadas contra *Leptospira interrogans* de cinco granjas tecnificadas ubicadas en diferentes departamentos de Guatemala, utilizando la técnica de microaglutinación (MAT). Se emplearon 12 serovares de *Leptospira interrogans* para llevar a cabo la prueba: *Ballum*, *Bratislava*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Panamá*, *Icterohaemorrhagiae*, *Sejroe*, *Australis*, *Canícola*, *Hebdomadis*, *Autumnalis* y *Bataviae*. Se consideraron positivos los sueros que presentaron 50% de aglutinación, de los cuales 14 fueron seropositivos correspondiendo al 28% de la población total muestreada. Las cinco granjas presentaron hembras afectadas con Leptospirosis, siendo una fuente de diseminación para la granja.

El análisis estadístico demuestra que la serovariedad que se presentó con mayor frecuencia fue la *Pomona* y en menor frecuencia la serovariedad *Ballum*.

Las serovariedades identificadas como positivas fueron 5: *Ballum*, *Pomona*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pyrogenes* y *Panamá*.



## X. BIBLIOGRAFÍA

1. Alfaro, C; Aranguren, Y; Clavijo, A. 2004. Epidemiología diagnóstica de la leptospirosis como fundamentos para el diseño de estrategias de control (en línea). Revista digital CENIAP hoy. no. 6, Consultado 10 abr. 2007. Disponible en [www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n6/arti/alfaroc/arti/alfaroc.htm](http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n6/arti/alfaroc/arti/alfaroc.htm)
2. Braselli, A. s.f. Leptospirosis (en línea). Consultado 15 feb. 2007. Disponible en [www.pcca.com.ve/vp/articulos/e34p26.htm](http://www.pcca.com.ve/vp/articulos/e34p26.htm)
3. Caballero, AS; García, JR. 1997. Manual de Procedimientos de laboratorio del instituto nacional de diagnóstico y referencia epidemiológicos (INDRE). s.n.t. 41p.
4. Cisneros Puebla, MA; Moles Cervantes, LP; Gavaldón Rosas, D. 2000. Serología diagnóstica de leptospirosis porcina en México (en línea). Revista cubana Med trop. Consultado 12 feb. 2007. Disponible en <http://209.85.165.104/search?q=cache:H5c8nE2iePcJ:www.ipk.sld.cu/lepto.2004/lepto1/6mtr0702.pdf+leptospirosis+cerdas&hl=es&ct=Clnk&cd=2&gl=gt>
5. Floss, JL; Tubs, RC. 2006. Causas infecciosas de Infertilidad en las cerdas (en línea). Consultado 10 abr. 2007. Disponible en <http://www.porcicultura.com/articulos/reproduccion/articulo.php?tema=repo05>
6. Mailxmail. s.f. Leptospirosis en cerdos (en línea). Consultado 12 feb. 2007. Disponible en [http://www.leptospirosisencerdos\\_cursos.Gratismailxmail\\_com.htm](http://www.leptospirosisencerdos_cursos.Gratismailxmail_com.htm)
7. Monografías.com, CU. s.f. Leptospirosis (en línea). Consultado 17 ene. 2007. Disponible en <http://www.monografias.com/trabajos17/Leptospirosis/leptospirosis.shtm>
8. Murray, PR. 2000. Manual of clinical microbiology. 7ed. Washington, American Society For Microbiology. 744p.

9. Polo Díaz, OD. 2007. Determinación de la presencia de anticuerpos de *Leptospira interrogans*, en perros no vacunados: por la prueba de microaglutinación (MAT), en clínicas veterinarias ubicadas en la zona 18 de la capital de Guatemala. Tesis Lic. Med. Vet. Guatemala, GT, USAC/FMVZ. 59p.
10. Sandow, K.; Ramírez, S. 2005. Leptospirosis (en línea). Consultado 02 ene. 2007. Disponible en <http://www.monografias.com/17/lep/shtml>
11. Sikahall Prado, SV. 2006. Estandarización de la prueba de Aglutinación Microscópica en Placa (MAT) para el diagnóstico de leptospirosis humana. Tesis Lic. Quim. Bio. Guatemala, GT, USAC/FMVZ. 53p.
12. Smith, H.; Jones, T. 1962. Patología Veterinaria. 2 ed. México, Hispano americana. p. 451-454.
13. Vides López, IT. 2005. Determinación de la presencia de *Leptospira sp* en la especie cotuza (*Daciprocta punctata*) en un zoológico privado de la ciudad de Guatemala. Tesis Lic. Med. Vet. Guatemala, GT, USAC/FMVZ. 48 p.
14. Zielinski, GC. 2000. Fallas reproductivas en cerdas: aspectos sanitarios (en línea). Consultado 17 ene. 2007. Disponible en <http://www.ecampo.com/media/news/nl/ganporcinosreprod8.htm>
15. Zamora, Y. 2006. International course on laboratory methods for the diagnosis. s.n.t. 109p.

# **XI. ANEXOS**

TABLA No. 1

Tabla de frecuencia de muestras positivas a diferentes serovares de *Leptospira*

Serovares	No. De muestras positivas	Porcentaje
Ballum	1	2
Pomona	6	12
Icterohaemorrhagiae	3	6
Panamá	2	4
Pyrogenes	2	4
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>28</b>

Las cepas que presentaron valores negativos no fueron incluidas en la tabla de frecuencia.

## GRÁFICA No. 1

Cepas con mayor frecuencia en las granjas muestreadas

